市販ELISAキットを使用した作物残留農薬分析における妨害とホウレンソウでの妨害回避法の検討

誌名	埼玉県農林総合研究センター研究報告 = Bulletin of the Saitama Prefectural Agriculture and Forestry Research Center
ISSN	13467778
著者	小林, 由美 佐藤, 賢一
巻/号	7号
掲載ページ	p. 56-65
発行年月	2008年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波事務所
Tsukuba Office, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

AgriKnowledge

埼玉農総研研報(7)56-65, 2007

市販ELISAキットを使用した作物残留農薬分析における妨害とホウレンソウでの妨害回避法の検討

小林　由美*，佐藤　賢一**

Vegetable Extracts Interfere with ELISA for Pesticide Residue Anarysis and Exclution Method of Interfering Substance on Spinach

Yumi KOBAYASHI，Kenich SATO

要約　本県の主要農産物であるダイコン，ニンジン，ネギ，ブロッコリーとホウレンソウの市販ELISAキット7種類（ホリバ・バイオテクノロジー（現在は堀場製作所）製のSmartAssayシリーズのアセタミプリド，イプロジオン，イミダクロプリド，クロルフェナピル，クロロタロニル，フェニトロチオン測定用キットとSDI社製のダイアジノン測定用キット）による残留農薬分析について検討した．今回検討した作物のうちホウレンソウを除けば，従来から示されている方法(磨砕均質化試料からメタノールで農薬を抽出し，水で適宜希釈後市販ELISAキットに供し測定する）による分析で，機器分析と同程度の分析結果が得られ，分析値への妨害の程度は微小であった．ホウレンソウは，一部ELISAキットで，吸光度が大きく低下し，分析値に大きな誤差が生じた．ホウレンソウのELISAキットによる妨害回避法として，限外ろ過を分析法に取り入れることにより，機器分析と同程度の分析結果が得られる．

農作物の安全・安心確保の取り組みとして生産履歴の管理・公開が重要視されている．特に消費者の残留農薬への関心は高く，生産者はそれに応えるために農薬使用暦や残留農薬分析結果の公表を始めている．残留農薬分析は分析機関に委託されることが多いが，時間と費用の点から生産者自らが生産現場で実行可能な迅速かつ簡便な残留農薬の分析法が求められている．

迅速かつ簡便な残留農薬分析手法としてELISA法は注目されるが，作物体に含まれる夾雑物により擬陽性を示すマトリクス効果があるなどの問題点が指摘されている(津村ら，1992)．特に，ネギとホウレンソウについては，作物成分の影響が大きいことも報告されている(中澤，2000)．

そこで，本県主要農産物であるダイコン，ニンジン，ネギ，ブロッコリーおよびホウレンソウを対象とし，市販ELISAキット7種類に対し作物中成分がその測定値に及ぼす妨害の程度を確認し，妨害の大きいホウレンソウについては，限外ろ過の利用により，妨害を回避できたのでここに報告する．

なお，本報告は先端技術を活用した農林水産研究高度化事業「残留農薬評価のための地域特産物の分類法及び迅速検出法の開発（2003～2005)」による成果の一部である。

材料および方法

1　試料

ダイコン，ニンジン，ネギ，ブロッコリーおよびホウレンソウは農林総合研究センターで栽培され，農薬使用履歴の明らかなサンプルを用いた．

2　試薬

有機溶媒は残留農薬分析用，その他の試薬は残留農薬分析用及び特級品，水は純水を用いた．標準品

本研究の一部は，農薬学会第31回大会(2006年3月)に発表した．

*農産物安全性担当（現水田農業研究所），**農産物安全性担当

は，農薬分析用を，有機溶媒に溶解し適宜希釈して用いた．

3　ELISAキット

ELISA キットは，ホリバ・バイオテクノロジー製の SmartAssay シリーズを主に用いた．アセタミプリド（測定範囲：(以下同じ) 0.3 ～ 4ppb)，イプロジオン（1.5 ～ 30ppb)，イミダクロプリド（2 ～ 100ppb)，クロルフェナピル（2 ～ 10ppb)，クロロタロニル（0.15 ～ 15ppb)，フェニトロチオン（0.15 ～ 2ppb（高感度タイプ)）それぞれの測定用キットである．キット内容は，抗体プレート（96 ウェル，8 × 12 列)，標準試薬 L，標準試薬 H，酵素標識物試薬，発色試薬，反応停止試薬，プレートシール，取扱説明書からなる．

その他 SDI 社製の EnviroGard シリーズのダイアジノンキット（測定範囲：0.03 ～ 0.5ppb）を使用した．キットの内容は，抗体プレート（96 ウェル，12 × 8 列)，農薬標準試薬，酵素標識物試薬，発色試薬，反応停止試薬，取扱説明書からなる．

4　装置

ELISA 法：吸光光度計（SmartReader「MPR-01」)
機器分析法：高感度窒素燐検出器付きガスクロマトグラフ（GC-17A，hp6890)，高速液体クロマトグラフ（LP7000)

5　ELISAでの分析方法

磨砕均質化試料 20g にメタノール 100mL 加え，30 分間振とう後，ろ紙（No. 5B）でろ過，1mL 分取し水 7.5mL を加えて希釈したものを作物試験溶液とした．

測定用 ELISA キットの操作方法はメーカー指定の方法に従った．

分析値の算出は，以下の方法で行った．①試験溶液および標準試薬 L，H を ELISA キットで操作し発色させる．②その発色の濃淡を分光光度計で数値化し吸光度を得る．③標準試薬の ELISA で得られた吸光度での検量線に試験溶液で得られた吸光度をあてはめ，分析値を算出する．以下，本報告で吸光度は ELISA 操作によって得られた波長 450nm の吸光度を示す．

なお，試験によっては，水もしくは 50%リン酸を磨砕均質化時に添加，あるいは試料とメタノールの割合および希釈率の変更を行った．

6　作物がELISAによる分析値に及ぼす妨害の有無

(1)　既知の農薬濃度における，作物試験溶液と 10 %メタノール含有水との比較

先の調整法で得られた作物試験溶液，および対照溶液としての 10%メタノール含有水（メタノール：水＝ 1:9，v/v）に，ELISA キットの測定範囲で農薬標準品を添加し，農薬標準溶液列を作成した．試験溶液と対照の ELISA で得られた吸光度を比較し，作物由来の妨害の有無や程度を検討した．

ダイアジノン試験用の作物試験溶液は，磨砕均質化試料にメタノールを加え振とう抽出，ろ過後に試料の 200 倍および 1000 倍に水で希釈し作成した．対照は 1 %メタノール含有水（メタノール：水＝ 1:99，v/v）を使用した．

(2)　Blank 試料で作成した作物試験溶液と標準試薬 L との比較

農薬添加試験により，吸光度が乖離する場合は低濃度域でその度合いが大きいことが明らかとなった．そこで，試験対象農薬が含まれていない作物試料（Blank 試料）を抽出し、作成した作物試験溶液と対照として ELISA キットの定量下限濃度の吸光度を比較することにより作物が ELISA に及ぼす妨害の程度を調べた．ELISA キットの定量下限濃度は，SmartAssay シリーズの場合メーカーがキットに付属した農薬標準液（標準試薬 L）の濃度とした．ダイアジノンキットの場合は 0.03ppb とした．試験結果は，数回の平均をとるため吸光度比（B/B0 %）で表した．B/B0%の求め方は下記の式による．

$$\text{B/B0 \%} = \frac{\text{作物試験溶液の ELISA で得られた吸光度}}{\text{対照（10%メタノール）の ELISA で得られた吸光度}} \times 100$$

(3)　妨害要因の推定（ホウレンソウと他の葉菜類の試験溶液における ELISA によって得た吸光度の比較）（妨害要因物質のイミダクロプリド精製操作における挙動)

ホウレンソウにおけるイミダクロプリド分析で吸光度減少という妨害が明確に現れた．そこで，妨害要因となる物質が，葉緑素の多く含まれる葉菜類に共通の物質か，ホウレンソウに特有の物質かを明らかにするため，ホウレンソウおよび参考としてシュンギク，コマツナ，ミツバ，ネギの作物試験溶液にイミダクロプリドを添加し，ELISA で得られた吸光度を比較した．

さらに，妨害要因物質を推定するため，HPLC によるホウレンソウのイミダクロプリド分析で用いられる精製操作の途中で分取した試料液から ELISA 測定に悪影響を及ぼす有機溶媒をエバポレーターで留去し，これを 10 %メタノールに再溶解し ELISA キットで測定し，妨害要因物質を推定した．精製操作は以下の手順で行った．多孔性ケイソウ土カラムにホウレンソウの有機溶媒抽出液から有機溶媒を留去したものを負荷し，ヘキサンを流下して夾雑物を分画除去する（画分 1）．次にヘキサン／酢酸エチル混液を流下しイミダクロプリドが含まれる画分を溶出する（画分 2）．その溶出液の有機溶媒を留去し，ヘキサンに再溶解後シリカゲルミニカラムに負荷する．ヘキサンを流下し夾雑物を分画除去する（画分 3）．さらにヘキサン／酢酸エチル混液を流下し（画分 4），酢酸エチルを流下しイミダクロプリドが含まれる画分を溶出する（画分 5）．

7　妨害回避法の検討（ホウレンソウ）

(1)　試験溶液の希釈による妨害回避効果

ホウレンソウを試料とした ELISA で吸光度が小さくなる（つまり分析値が大きくなる）測定妨害がおきる．そこで、ホウレンソウが原因となる妨害の回避法を検討した．先の調整法で得られたホウレンソウ試験溶液を 10%メタノールでさらに追加希釈，ELISA キット（イミダクロプリド測定用）に供し妨害回避可能な希釈倍率とその時の測定範囲を調べた．試験は，イミダクロプリド測定用 ELISA キットを使用した．

(2)　メンブレンフィルターあるいは抽出溶媒の変更による妨害回避効果

ホウレンソウからメタノールによって農薬と共に抽出される妨害要因物質の除去法を検討した．水で希釈したメタノールを抽出溶媒にすることによる妨害要因物質溶出抑制の効果，メンブレンフィルターによる妨害要因物質除去効果，抽出時の活性炭粉末添加処理による妨害要因物質吸着除去効果について無処理の吸光度と比較した．メンブレンフィルターは孔径 0.45 μ m と 0.2 μ m を使用し数品種のホウレンソウを試験した．活性炭粉末はイミダクロプリド試験は Envi-Carb 粉末（SPELCO 社製）を試料重量の 10%，ダイアジノン試験はグラファイトカーボンブラック粉末（GL サイエンス社製）を試料重量の 2 割・5 割・同量使用した．メンブレンフィルターの効果はイミダクロプリド，抽出溶媒の変更および活性炭粉末の効果はイミダクロプリドとダイアジノンそれぞれの測定用 ELISA キットを使用した．

(3)　限外ろ過の利用（イミダクロプリド）

限外ろ過の有効性が玄米等で報告されている（畠山ら 2004）ことから，その効果について試験した．

試験には、ADVANTEC 製限外ろ過膜フィルターユニット（USY-1，分画分子量 10,000）を使用し，イミダクロプリドを添加後に限外ろ過処理したホウレンソウ試験溶液とイミダクロプリド添加 10%メタノール含有水（対照）の吸光度を比較した．さらに数品種のホウレンソウ試験溶液の限外ろ過処理と無処理の ELISA によって得た吸光度を比較した．

また，限外ろ過によって妨害物質を分離したことを確認するため，ろ過膜上に残った残渣をメタノールに再溶解しつつ回収し，水で希釈後 ELISA で測定した．

アセタミプリド，イプロジオン，クロルフェナピル，フェニトロチオンとダイアジノン各々の測定用 ELISA キットについてもホウレンソウによる分析妨害の限外ろ過処理による回避効果を無処理と比較し確認した．

8　機器分析法との比較評価

ELISA キットを用い，ほ場で農薬製剤を散布して栽培したサンプルについて ELISA 法と機器分析法による測定値の比較評価を行った．ELISA 法によるホウレンソウのイミダクロプリド分析には，限外ろ過，ダイアジノン分析は 50%メタノール含有水抽出法による妨害回避法を加えた．ELISA 法によるブロッコリーのダイアジノン分析は 300 倍と 500 倍希釈溶液を用いた．

結　果

1　作物がELISAに及ぼす妨害の有無

(1)　既知の農薬濃度における，作物試験溶液と 10 %メタノール含有水との比較

作物から作成した試験溶液と対照の 10%メタノール含有水にそれぞれ既知濃度の農薬を添加して得られた吸光度をプロットしたものの一部を図 1 ～ 3 に示した．

イミダクロプリドを添加したネギ試験溶液およびイプロジオンを添加したニンジン試験溶液の吸光度

は，10%メタノール含有水に農薬添加した対照のそれと測定範囲内においておおむね一致していた．フェニトロチオンを添加したネギの試験溶液は，低濃度域で対照に比べて吸光度が小さくなったが，全体的に吸光度は一致していた．クロロタロニルを添加したニンジンとダイコン（葉および根）試験溶液は，測定濃度全体で対照と比べて吸光度がわずかに小さくなった（図 1）．イミダクロプリドを添加したホウレンソウ試験溶液は，対照に比べ吸光度が大きく減少した（図 2）．ダイアジノンを添加したネギとホウレンソウの試験溶液は，希釈倍率によって結果に違いがあった．200 倍希釈で作成したネギとホウレンソウ試験溶液の吸光度は対照の吸光度に比べて小さかった．しかし，1000 倍希釈で作成した試験溶液は，対照とほぼ同じ吸光度であった（図 3）．

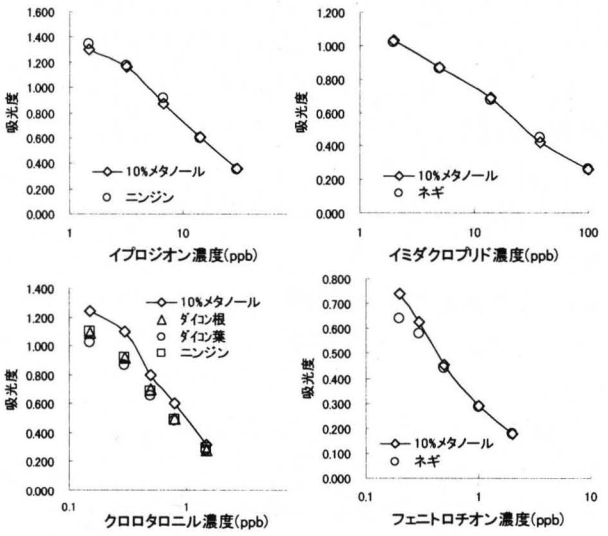

図 1　農薬を添加した作物試験溶液と対照（10 %メタノール含有水）の ELISA で得られた吸光度

※1 プロットは 3 サンプルの平均吸光度を表す

ダイコン（葉および根）はクロロタロニル以外にアセタミプリド・クロルフェナピルについて，ニンジンはイプロジオンとクロロタロニル以外にアセタミプリド・クロルフェナピル・ダイアジノンについて，ネギはイミダクロプリド・ダイアジノン・フェニトロチオン以外にアセタミプリド・クロルフェナピルについて，ブロッコリーはアセタミプリド・クロルフェナピル・フェニトロチオンについて試験した．この組み合わせにおいて，いずれの作物の試験溶液も対照の 10 %メタノール含有水と同じ農薬添加濃度における吸光度はおおむね一致していた．

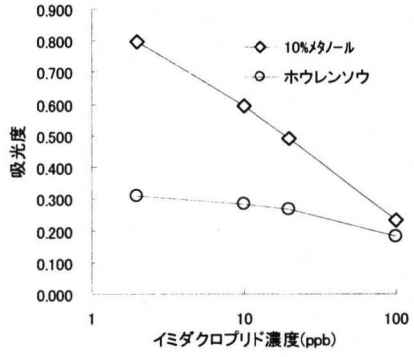

図 2　イミダクロプリドを添加したホウレンソウ試験溶液と対照（10 %メタノール含有水）の ELISA で得られた吸光度

※1 プロットは 2 サンプルの吸光度平均を表す

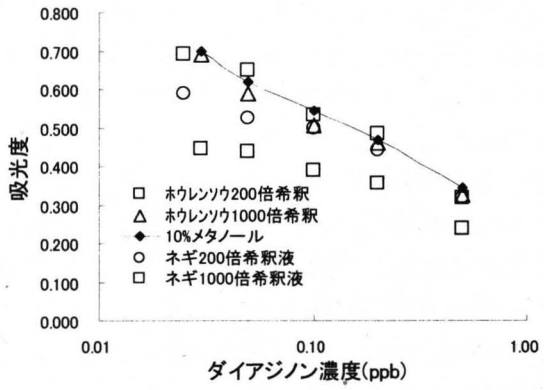

図 3　ダイアジノンを添加したホウレンソウとネギの試験溶液と対照（10 %メタノール含有水）の ELISA で得られた吸光度

※1 プロットは 2 サンプルの吸光度平均を表す

(2)　Blank 試料で作成した試験溶液と標準試薬 L との比較

ELISA キットと作物の組み合わせで得られた吸光度比（B/B0%）を表 1 に示した．ニンジン・ネギとダイアジノンの組合せ以外はいずれの作物も B/B0%は 100 以下となり，10 %メタノールより小さかった．ネギとアセタミプリド，クロロフェナピル，ブロッコリーとクロルフェナピル・ダイアジノン，ホウレンソウとアセタミプリド・イプロジオン・イミダクロプリド・クロルフェナピル・高感度フェニトロチオン・ダイアジノン，ニンジンとクロルフェナピル・ダイコン葉とクロルフェナピル・クロロタロニル，ダイコン根とクロルフェナピルそれぞれの ELISA において Blank 試料（試験対象農薬を

表1　Blank試料および標準試薬Lの吸光度と10%メタノールの比（B/B0 %[1)]）

対象農薬＼作物	ネギ	ブロッコリー	ホウレンソウ	ニンジン	ダイコン葉	ダイコン根	標準試薬L
アセタミプリド	**88% ±2%(n=8)**	98% ±5%(n=2)	**82% ±1%(n=8)**	95% ±2%(n=6)	92% ±4%(n=3)	95% ±2%(n=3)	**92% ±2%(n=9)**
イプロジオン	96% ±2%(n=6)	−	**88% ±2%(n=6)**	97% ±2%(n=6)	96% ±2%(n=6)	94% ±2%(n=6)	**89% ±3%(n=6)**
イミダクロプリド	87% ±1%(n=6)	−	**32% ±1%(n=6)**	90% ±7%(n=6)	90% ±2%(n=6)	87% ±1%(n=6)	**80% ±1%(n=6)**
クロルフェナピル	**90% ±3%(n=9)**	**89% ±5%(n=3)**	**83% ±3%(n=9)**	**89% ±4%(n=6)**	**93% ±5%(n=6)**	**88% ±3%(n=6)**	**95% ±4%(n=5)**
クロロタロニル[2)]	−	−	−	97% ±3%(n=6)	**90% ±2%(n=6)**	93% ±2%(n=6)	**93% ±2%(n=6)**
フェニトロチオン[3)]	79% ±2%(n=6)	78% ±0%(n=3)	**69% ±2%(n=6)**	94% ±4%(n=3)	87% ±3%(n=3)	91% ±2%(n=3)	**74% ±2%(n=3)**
ダイアジノン[4)]	101% ±0%(n=2)	**86% ±2%(n=8)**	**100% ±7%(n=2)**	104% ±5%(n=2)	−	−	**95% ±2%(n=11)**
作物平均	90%	88%	**76%**	95%	91%	91%	**88%**

1）B/B0%は、（Blank試料の吸光度／10%メタノールの吸光度）の百分率±標準誤差（n=サンプル数）
農薬標準品Lとそれより吸光度が小さくなる組み合わせは太字で表す
2）クロロタロニルの吸光度は0.1%リン酸含有の10%メタノールの吸光度をB0としている
3）ELISAキットは高感度タイプを使用した
4）ダイアジノンは作物試験溶液の希釈率は下記の通り、標準試薬Lは0.03ppbを作成した
ﾈｷﾞ・1000倍、ﾌﾞﾛｯｺﾘｰ・600倍、ﾎｳﾚﾝｿｳ・1000倍、ﾆﾝｼﾞﾝ・900倍

含まない試料）がキット付属の標準試薬 L より小さい吸光度であった．ホウレンソウのイミダクロプリド分析の場合に吸光度は大きく減少した．フェニトロチオン分析でもホウレンソウの吸光度は他作物に比べ減少した．

(3)　妨害要因の推定（ホウレンソウと他の葉菜類の試験溶液における ELISA によって得た吸光度の比較）（妨害要因物質のイミダクロプリド精製操作における挙動）

作物試験溶液の色はシュンギクがもっとも濃く，次にホウレンソウが濃かった．ネギはもっとも色が薄かった．ELISA によって得た吸光度がもっとも乖離したのは，ホウレンソウだった．コマツナは低濃度域でやや吸光度が小さくなったもののほぼ対照と同じであった．シュンギク・ネギ・ミツバの作物試験溶液は，対照の 10 %メタノールと ELISA によって得た吸光度がほぼ同じであった（図 4）．

ホウレンソウの HPLC によるイミダクロプリド分析で用いられる精製操作の各段階の分取画分を ELISA キットで測定した結果は，表 2 に示すとおりであった．多孔性ケイソウ土カラムで分画したホウレンソウのメタノール抽出物は，ヘキサン画分(1)ではイミダクロプリドが検出されず，ヘキサン／酢酸エチル混液画分(2)でイミダクロプリドが検出された．その後の，シリカゲルミニカラムによる精製ではイミダクロプリドはヘキサン画分(3)では検出されず，ヘキサン／酢酸エチル混液画分(4)で 3.56 ppm，その後の酢酸エチル画分(5)で 1.12 ppm 検出された．供試サンプルにはイミダクロプリド剤は使用されていない．

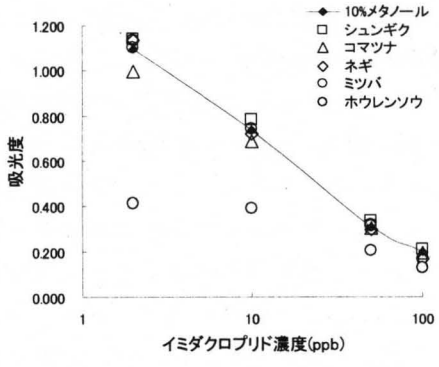

図 4　イミダクロプリドを添加したホウレンソウと他の葉菜類の吸光度
※1プロットは2サンプルの吸光度平均

表 2　ホウレンソウの精製過程で分取した成分の ELISA によるイミダクロプリド測定値

分取画分		ELISA測定値(ppm)
多孔性ｹｲｿｳ土ｶﾗﾑ		
ヘキサン	(1)	0.25
ヘキサン／酢酸ｴﾁﾙ	(2)	3.52
ｼﾘｶｹﾞﾙﾐﾆｶﾗﾑ		
ヘキサン	(3)	0.09
ヘキサン／酢酸ｴﾁﾙ	(4)	3.56
酢酸エチル	(5)	1.12

2　妨害回避法の検討（ホウレンソウ）

(1)　試験溶液の希釈による妨害回避効果

ホウレンソウ試験溶液を追加希釈していくと，得られた吸光度は 10%メタノールのそれに近づいた（図 5）．通常の希釈倍率である 51 倍希釈より 51 × 8 倍，51 × 8 倍より 51 × 16 倍というように希釈を大きくするほど対照の 10%メタノールの吸光度との乖離は小さくなった．

(2)　メンブレンフィルターあるいは抽出溶媒の

変更による妨害回避効果

作物試料から農薬を抽出するのに使う溶媒であるメタノールに水を加えその含有割合を少なくし妨害

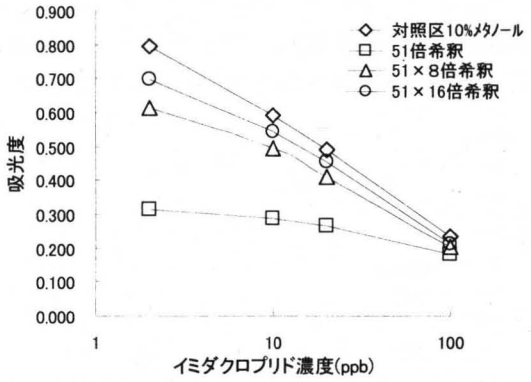

図 5　ホウレンソウ試験溶液の希釈による妨害回避効果（イミダクロプリド）
※1プロットは2サンプルの吸光度平均を表す

物質の溶出抑制を試みた結果を図 6，8 に示す．イミダクロプリド測定の場合，どの抽出溶媒を用いても，得られたホウレンソウ抽出液の吸光度は対照の10%メタノールと比べて小さくなった（図 6）．メタノール抽出＜ 50%メタノール含有水抽出＜ 10%メタノール含有水抽出＜水抽出の順に吸光度は大きくなり，対照に近づいたが乖離は大きかった．ダイアジノン測定の場合，結果にばらつきが大きいもののメタノール抽出＜ 50%メタノール含有水抽出＜10%メタノール含有水抽出の順に吸光度が大きくなり，対照に近づいた（図 7）．10%メタノール含有水による抽出は，ほぼ対照と同じ吸光度であった．

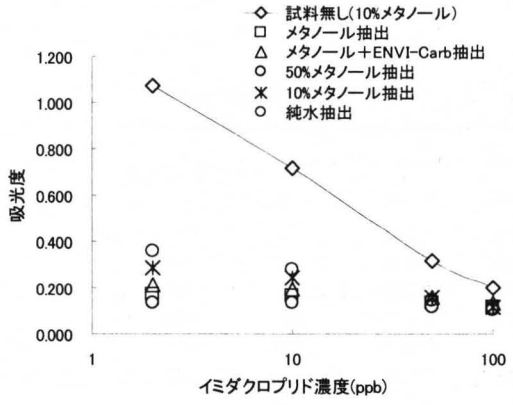

図 6　抽出方法の違いによる妨害回避効果（ホウレンソウ・イミダクロプリド）
※1プロットは2サンプルの平均吸光度を表す

抽出時の活性炭粉末添加による妨害物質吸着の試みの結果イミダクロプリド測定の場合，対照との吸光度乖離の状況は無添加と同様大きかった．（同図 6）．ダイアジノン測定の場合は活性炭粉末（グラファイトカーボンパウダー）の抽出時添加量が増すほど ELISA の結果得られた吸光度は対照に近づいた（図 8）．

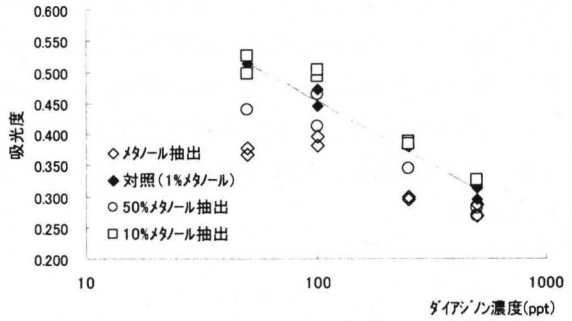

図 7　抽出方法の違いによるによる妨害回避効果（ホウレンソウ・ダイアジノン）
※1プロットは1サンプルの吸光度を表す

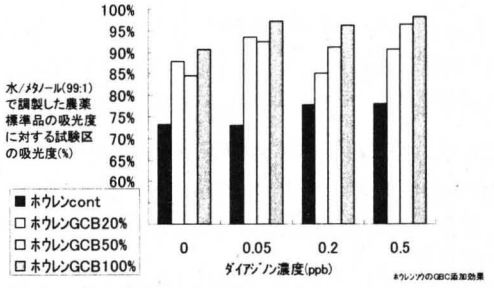

図 8　活性炭粉末の抽出時処理による妨害回避効果（ホウレンソウ・ダイアジノン）
※1プロットは2サンプルの吸光度を表す

抽出後の希釈液をメンブレンフィルターによってろ過し妨害物質の除去を試みた結果を図 9 に示す．

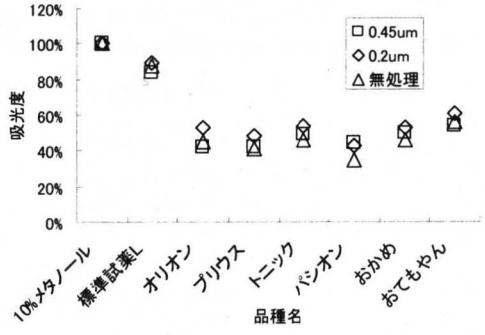

図 9　メンブレンフィルターによる妨害回避効果（ホウレンソウ・イミダクロプリド）
※1プロットは2サンプルの平均吸光度を表す

イミダクロプリドの含まれていないホウレンソウか

ら作成した作物試験溶液の ELISA によって得た吸光度は対照の 10%メタノールや定量限界濃度の農薬標準品 L のそれと比べ小さくメンブレンフィルターでろ過しない場合と同様であった.

(3) 限外ろ過の利用（イミダクロプリド）

文献で限外ろ過膜フィルターユニットに妨害回避効果があるとされていたので，市販の限外ろ過フィルターユニット（ADVANTEC USY-1）がホウレンソウの ELISA 分析に使用できるか試験した．ホウレンソウ試験溶液にイミダクロプリドを添加し，限外ろ過した試験溶液と対照の吸光度は良く一致していた（図 10）.

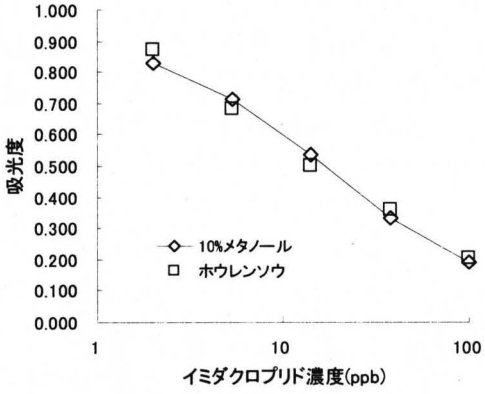

図 10 イミダクロプリド添加後限外ろ過処理したホウレンソウ試験溶液と 10 %メタノールの吸光度比較

※1プロットは2サンプルの平均吸光度を表す

Blank 試料による試験の結果，品種の異なるホウレンソウでも限外ろ過後の供試液は対照と同様の吸光度を示し，限外ろ過しない供試液の吸光度とは明らかに異なった（図 11）．限外ろ過膜上に残った残渣の ELISA によって得た吸光度は，限外ろ過無処理の試験溶液と同様に小さく，対照と乖離していた（図 12）.

イミダクロプリド以外の測定キットについても限外ろ過処理と無処理を比較した．試験した 6 種類のキットにおいても，無処理と比べ，B/B0%は 100 に近づいた（表 3）.

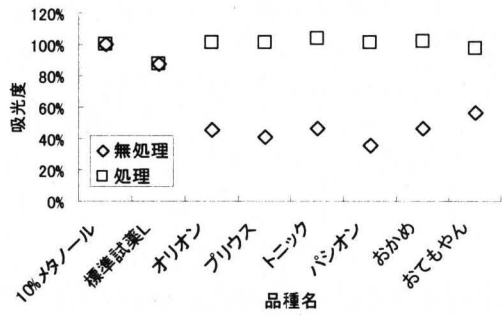

図 11 限外ろ過による妨害回避効果（ホウレンソウ・イミダクロプリド）

※1プロットは4サンプルの平均吸光度を表す

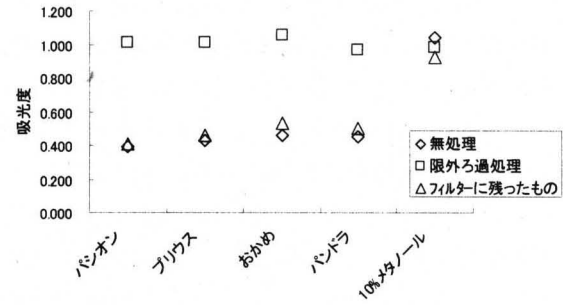

図 12 限外ろ過による妨害回避効果（ホウレンソウ・イミダクロプリド）

※1プロットは2サンプルの平均吸光度を表す

表 3 ホウレンソウの ELISA における限外ろ過による妨害回避効果（B/B0%[1]）

	対象農薬	ホウレンソウ				標準試薬L
		パンドラ	おかめ	プリウス	パシオン	
無処理	アセタミプリド	76%	82%	83%	85%	92%
	イプロジオン	90%	91%	93%	102%	89%
	イミダクロプリド	43%	44%	41%	38%	95%
	クロルフェナピル	93%	100%	105%	99%	85%
	フェニトロチオン[2]	57%	77%	83%	81%	80%
	ダイアジノン	51%	63%	74%	69%	89%
限外ろ過処理	アセタミプリド	94%	106%	100%	98%	—
	イプロジオン	98%	102%	103%	107%	—
	イミダクロプリド	99%	107%	103%	103%	—
	クロルフェナピル	89%	95%	103%	89%	—
	フェニトロチオン[2]	94%	96%	104%	96%	—
	ダイアジノン	98%	96%	94%	89%	—

1）B/B0%は試験溶液の吸光度を10%メタノールの吸光度で除した百分率（2点平均）

2）ELISAキットは高感度タイプを使用した

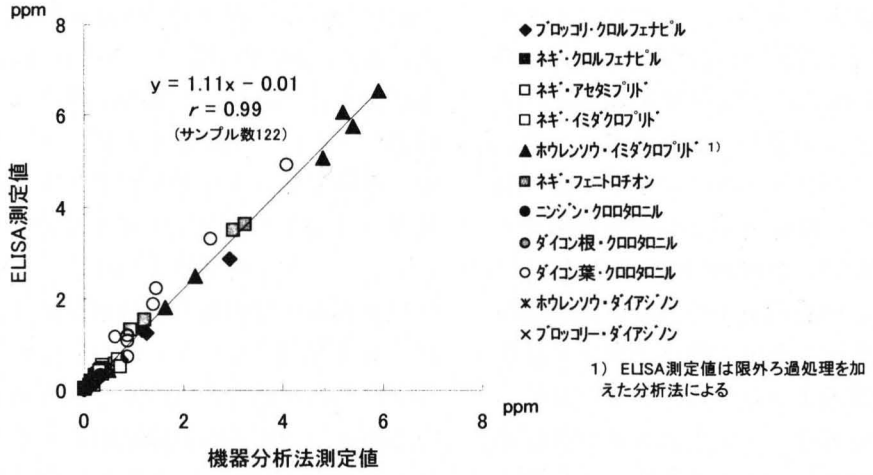

図 14　ELISA キットによる 5 作物の残留農薬測定値と機器分析法による測定値との相関性

3　機器分析法との比較評価

図 13 に示す作物と農薬の組み合わせで，機器分析法（GC，HPLC）と ELISA 法による分析値の相関性と傾きを調べた．相関係数 r は 0.99（P 値=2.6 × 10^{-107}），傾きは 1.11（標準誤差± 0.01），切片は-0.01（標準誤差± 0.02）を示し，双方には高い相関関係があり，傾きから ELISA 分析の方がやや測定値が高くなるものの，両分析法で同じ値が得られることが認められた（図 14）．

考　察

1　作物がELISAに及ぼす妨害の確認

作物抽出液由来の妨害が起こることはイチゴやハーブ類や大阪しろななどで報告がある（渡辺ら 2005）（橋本・権田 2004）（矢吹ら 2004）．同濃度のコントロール（作物試料を含まない対照）より吸光度が小さくなる妨害は，ELISA 測定値を実際の作物残留濃度より多く誤り，測定対象農薬使用歴のない作物からも残留があるように誤認させる．既知濃度の農薬を添加した作物試験溶液と対照の比較から，妨害は低濃度域でより多く現れることがわかる．低濃度域のみ吸光度が乖離する作物と農薬の組み合わせもある．

分析対象農薬を含まない作物試料（Blank 試料）から作成した試験溶液と対照（作物試料無しメタノール 10%含有水）および定量限界濃度の農薬添加した対照の比較から，供試したいずれの作物もわずかな妨害を ELISA に及ぼした．さらに，作物によって ELISA に及ぼす妨害の程度に傾向がある．ホウレンソウは妨害が大きい．ネギとブロッコリーは大きくないが妨害を示しやすいといえる．ニンジンやダイコンは妨害が少ない．しかし，ホウレンソウを除いて今回試験したダイコン，ニンジン，ネギ，ブロッコリーは ELISA による分析値に影響を及ぼさないか，あったとしても極小さい．先の既知濃度の農薬添加試験の傾向からも，Blank 試料の吸光度が定量限界濃度の標準試薬 L より大きいならば，それ以上の濃度の測定では妨害はなく，一般的な使用における測定には影響しないと考える．そして ELISA キットは根菜類の一部の農薬を除いて基準値を確認するのに十分高い感度を有している．したがって，測定範囲の低濃度域での誤差に注意する必要はあるものの，基準値の確認のための使用に問題にはならないと考える．

そこで，ELISA に及ぼす妨害が大きいホウレンソウで妨害要因を明らかにしようと試みた．イミダクロプリド分析に及ぼす妨害は，シュンギクやコマツナとの比較から葉菜類に共通の葉緑素ではなく，精製操作における挙動からイミダクロプリドに極性などが近い物質であると推定する．また GC 分析の際には妨害となるネギ類の臭気成分やアブラナ科の含有窒素成分、ミツバの香気成分などは ELISA 分析に大きな妨害は及ぼさないといえる．

2　妨害回避手法の検討

妨害の大きいホウレンソウのイミダクロプリドおよびダイアジノン分析について回避法を検討した．

試験溶液の追加希釈によってリンゴなどの果実類は ELISA に及ぼす妨害が回避できるといわれてい

る（渡辺ら 2005，2006）．ホウレンソウのイミダクロプリド分析の際にも試験溶液（通常は作物の 51 倍液）の 16 倍追加希釈によって ELISA におよぼす妨害は小さくなったが，対照の 10 %メタノールと同じ吸光度ではなかった．イミダクロプリド測定用の ELISA キットは 2 ～ 100ppb がその測定範囲であるため，16 倍の追加希釈（作物試料の 816 倍）によってもホウレンソウの残留基準値 5ppm は測定範囲にある．しかし，今回の試験の際にホウレンソウ試験溶液の及ぼす妨害の大きさは常に一定ではなく品種や作型によっても異なり，完全に妨害が回避できていない場合に追加希釈によって妨害による測定誤差も拡大されるため，追加希釈は実用的ではないと考える．ダイアジノン測定用の ELISA キットは，試料の標準的な希釈方法がマニュアルとして添付されていない．作物の 200 倍希釈溶液と 1000 倍希釈溶液で試験した結果は，200 倍では妨害が大きく 1000 倍では妨害がなかった．ホウレンソウの他にニンジン，ネギとブロッコリーについても添加試験の結果などから希釈が十分に大きければ妨害は回避できると考える．妨害を及ぼさない十分な希釈倍率は，妨害を示しやすい作物とそうではない作物によって異なるが，600 倍～ 1000 倍であると推定する．

抽出溶媒に水を混合しメタノールの含有割合を小さくすることで妨害要因物質の抽出を抑制する試みは，ダイアジノン分析には有効で，イミダクロプリド分析にはその効果はほとんどない．抽出時の活性炭粉末添加処理による妨害要因物質を吸着除去する試みもまた，ダイアジノン分析には有効で，イミダクロプリド分析にはその効果はない．このことは，妨害要因物質が分析対象農薬によって異なることを示唆する．つまり ELISA 共通の発色反応に妨害が働くのではなく，抗原抗体反応の際に妨害がおこると筆者は推定する．ただし，ホウレンソウは多くの ELISA に対し妨害を及ぼすので，妨害要因物質は 1 種類ではなく多種類が複合していることも考えられる．

作物が ELISA に及ぼす妨害はミセルの影響によるもので，限外ろ過膜によってそれを除外することができるといわれている（畠山ら 2004）．また，限外ろ過による妨害回避効果は，様々な作物で試験され確認されている（天野，矢野 2006）（E.Hatakeyama 2006）．今回の試験結果で品種や ELISA キットの違いにかかわらず限外ろ過処理は妨害回避効果があった．また，限外ろ過されずに残った物質が ELISA を妨害することから，限外ろ過によって妨害物質が除去できることも確認できた．イミダクロプリド分析での結果からメンブレンフィルターでは妨害を回避できなかったので，妨害要因物質は容易にメンブレンフィルターを通過するほど小さい．しかし，ミセル生成の原因物質が限外ろ過されたことによるのか，妨害要因がミセルではないことを示すのかは明らかにできなかった．供試された ELISA キットすべてにおいて妨害回避効果があったことから，ホウレンソウの ELISA には限外ろ過処理を取り入れた方が良いといえる．

3　機器分析法との比較評価

機器分析法と ELISA 法による分析値を比較した．ELISA 法でホウレンソウのイミダクロプリドおよびダイアジノンを分析する場合は，限外ろ過による妨害回避法を加えた．相関性および傾きから ELISA 法は，機器分析法と同程度の精度を有していると判断された．

以上の結果から，野菜のほとんどは従来から示されている方法（磨砕均質化試料からメタノールで農薬を抽出し，水で適宜希釈後市販 ELISA キットに供し測定する）で分析しても機器分析と同程度の分析結果になる，つまり妨害の程度は微小であると筆者は考える．しかし，ホウレンソウではメタノールで抽出されるホウレンソウ由来の成分が ELISA キットでの反応を妨害し，吸光度を小さくするので，分析値に誤差が生じる．妨害回避法として，限外ろ過を分析法に取り入れることによって，他の野菜と同様に機器分析と同じ分析結果になる。

引用文献

天野昭子・矢野秀治(2006)：フェニトロチオンおよびイミダクロプリド測定用 ELISA キットにおけるキュウリのマトリクス効果について，日本農薬学会誌 vol31　No. 4，425-430.

橋本良子・権田優子(2004)：アセタミプリドイムノアッセイキットのセリ科作物（ハーブ類）への適用．第 27 回残留農薬分析研究会講演要旨集 71-75.

E.Hatakeyama *et al*(2006)：Determination of imazalil residues in citrus fruits by an enzyme-linked immunosorbent assay. 11th IUPAC Book of Abstracts (2) 200.

畠山えり子(2004)：市販 ELISA キットによる玄米中の残留農薬分析. 岩手県環保研センター年報 4, 90-94.

中澤裕之(2000)：残留農薬のイムノアッセイキットによる分析．食品中残留農薬検査の迅速化に関する調査研究研究報告書 平成 12 年度，73-117.

津村ゆかりら(1992)：市販分析キットによる食品中残留農薬の分析及びガスクロマトグラフ法との比較検討．食衛誌 vol.33,No. 5，458-466.

坂真智子ら(2005)：市販 ELISA キットの作物残留分析における活用について．第 28 回残留農薬研究会講演要旨集 31-36.

渡辺栄喜 ら(2005)：ネオニコチノイド系殺虫剤アセタミプリド用 ELISA キットの性能評価及び農作物中残留分析への応用．第 28 回残留農薬研究会講演要旨集 37-41.

渡辺栄喜(2006)：イムノアッセイで農作物中の残留農薬を簡易かつ迅速に検出する. 農業および園芸. 第 81 巻 第 9 号，981-987.

矢吹芳教ら(2004)：酵素免疫測定法による大阪特産農産物の残留農薬分析．第 27 回残留農薬研究会講演要旨集 76-77.